遺伝子機能解析のために
アンチセンス受託サービス

独自開発技術による目的遺伝子に対する最適な核酸インヒビターのデザイン・合成を承ります。

＊本受託サービスは、株式会社I.S.T（滋賀県大津市）と業務提携しておこなっております。

人や他の生物の遺伝子解読の完了にともない、特定の遺伝子の発現を特異的に阻害する技術（インヒビターテクノロジー）は遺伝子機能解析の研究手段として重要になってきました。代表的なインヒビターにはアンチセンスオリゴがあり、翻訳過程でmRNAと強く特異的に結合することによりターゲット遺伝子の機能を阻害します。これらのインヒビターの阻害精度は、ターゲット遺伝子に対して最適なインヒビターをデザインする技術レベルに大きく依存します。

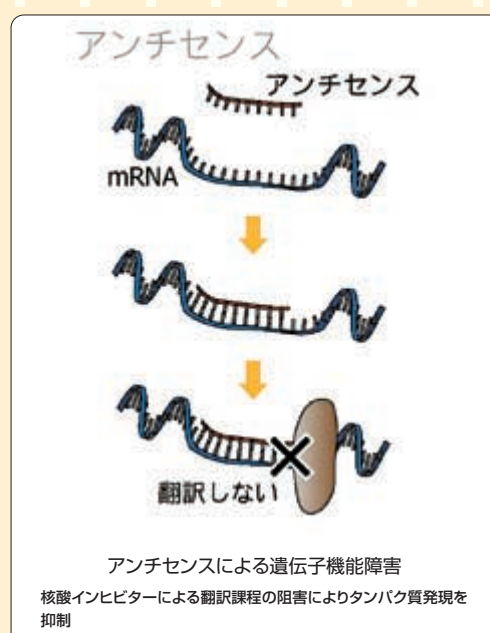
この度、独自開発したバイオインフォマティクス技術（GEIA™）及び実験技術からなる最先端の核酸インヒビターデザインテクノロジーを開発し、これまでに無い高精度の核酸インヒビターのデザインと合成が可能となりました。

特徴1 高精度
独自のGEIA™によるインヒビターデザインは、これまでに無い高い阻害精度を実現しました。

特徴2 簡便
合成した3つのインヒビターに加え、実験の最適化を行うためのキットも添付され、確実に実験を進めることができます。

特徴3 万全のサポート
スムーズな実験を可能とする安心のテクニカルサポート体制により、製品のフォローを行います。

アンチセンスによる遺伝子機能障害

核酸インヒビターによる翻訳課程の阻害によりタンパク質発現を抑制

核酸インヒビターデザイン過程

遺伝子情報の提供

お客様から、阻害したい遺伝子の名前や配列、GenBankのアクセス番号等をご提供していただきます。

GEIA™による核酸インヒビターデザイン

GEIA™により、その遺伝子に最適な核酸インヒビターをデザインします。

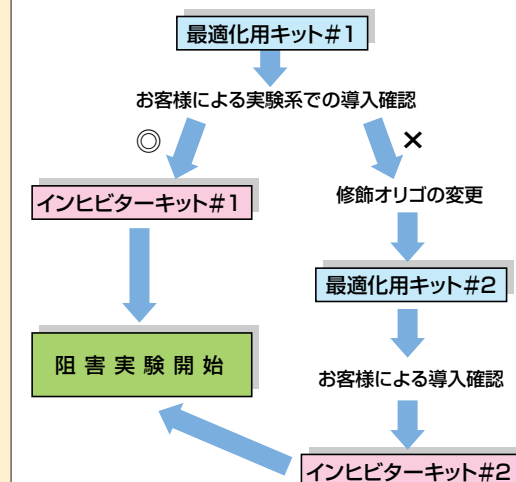
合成及び精製

デザインした核酸インヒビターを最新の設備により合成、精製いたします。

核酸インヒビターキットパッケージ

最終的にお客様には下記のようなキットでご提供いたします。

①最適化用キット+インヒビターキット
　（1）最適化用キット：標識オリゴ、ネガティブコントロールオリゴ
　（2）インヒビターキット：3種類の核酸インヒビター
②プロトコール
③オリゴ予測結果レポート
　（1）全てのmRNAとpre-mRNA配列上のおおよそのターゲット位置
　（2）インヒビター配列デザインに使用した配列とスプライシングパターン
　（3）関連する発現データ情報の概略（生物、組織、細胞の種類を含む）

アンチセンス実験のフローチャート

核酸インヒビターの実験の成否は、★核酸インヒビターのデザイン、★核酸導入の最適化、に依存します。したがって、本キットを用いればアンチセンス核酸の導入チェックを確実に行うことが実験の成功につながります。

IST社の核酸インヒビター技術

■デザイン

GEIA™は、IST社独自のアンチセンスをデザインするバイオインフォマティクスツールであり、遺伝子上の最適なターゲットmRNA結合部位を見つけ出し、高い阻害精度を持つインヒビターをデザインします。

●独自のアルゴリズムとデータベース:
GEIA™は独自のアルゴリズムとデータベースを利用することでターゲットmRNAに対する最適な核酸インヒビターの結合部位を予測、選択することができます。

●特定のスプライシングバリアントやpre-mRNAの阻害：
他のバイオインフォマティックスプログラムと異なり、GEIA™は遺伝子のスプライシングバリアントやpre-mRNAへのインヒビターデザインも可能で、お客様のターゲット遺伝子阻害実験の可能性を広げます。

●高い予測精度:
GEIA™は以下のフィルター処理を行うことにより、既存のバイオインフォマティクスプログラムでは成し得なかった高い核酸インヒビターの予測精度を誇っています。
- ・BLASTホモロジー検索
- ・毒性指標フィルター
- ・独自のデータベース
- ・統計アルゴリズム

■合　成

●核酸合成技術:
最適な核酸インヒビターを見つけるとすぐに、最新の施設により核酸インヒビターを合成、精製いたします。

●カスタム修飾:
多種に渡るスタンダード及び修飾したアンチセンス核酸をご提供します。

●高純度:
核酸インヒビターは厳密な内部評価に沿って合成、精製されます。

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
アンチセンス受託サービス 最適化用キット+インヒビターキット プロトコール オリゴ予測結果レポート	1式	-	-	応　談

※価格は対象遺伝子のサイズ、修飾オリゴの種類などにより異なります。見積りいたしますのでお気軽にお問い合わせください。
＊納期は、注文後2～4週間かかります。
＊ご注文時には、必ず遺伝子情報（遺伝子の配列、生物由来）をご提供ください。またオプション情報として、mRNAまたは　pre-mRNA配列、領域を絞った予測情報（コード領域,スプライシング領域、エキソン、イントロン、SNPs）も可能な場合にはご提供ください。
＊合成された核酸インヒビター3種は、ユーザーの希望条件での予測オリゴのトップ3です。その他にオリゴの種類を追加で希望される場合は別価格となります。
＊核酸インヒビターの配列情報は、アンチセンス技術に関するノウハウを保護するため原則として添付されません。
但し、下記の条件の下で公開させていただきます。
①配列情報の使用は、原則として科学研究のための雑誌に投稿する場合とさせていただきます。それ以外の目的に関しては、別途料金をお支払いいただく場合がございます。
②公開された配列情報を用いて、弊社以外への合成依頼、お客様御自身での合成、第三者への配列の開示等を行わないことについて同意書にて同意いただきます。
③配列情報を医薬品として、又、工業製品等に使用する場合には、別途契約が必要になります。
＊全てのオリゴは研究用試薬です。診断または治療用途に使用することはできません。

Dual Quantitative RT-PCR(DQRT-PCR) Kit

目的遺伝子の発現を検出・測定するDRQRT-PCRキットです。

Dual Quantitative RT-PCR(DQRT-PCR)とは、MBI社が誇るMultiplex技術を応用した新規な定量PCR方法です。
従来のQuantitative Comparative RT-PCR(QCRT-PCR)は、Competitorの作製・Competitorの希釈系列のサンプル調製などの煩雑な準備が必要でした。DQRT-PCRは、Competitorとしてハウスキーピング遺伝子を利用することで、サンプル中のハウスキーピング遺伝子とTarget遺伝子をそれぞれに特異的なプライマーで同時に増幅を行い、Arrayと同様にハウスキーピング遺伝子の発現量に対するTarget遺伝子の相対的発現量を求める方法です。
そのためTarget遺伝子の絶対的発現量の比較は行えませんが、2サンプル以上間の相対的発現量の比較を簡便に行うことができます。約1,000品目の商品を取り揃えております。

	DQRT-PCR	QCRT-PCR	リアルタイムRT-PCR
経済性	★★★	★★	★
簡便性	★★★★	★★★	★★
信頼性	★★	★★	★★
感度	★★★★	★★★★	★★★★
特異性	★★★	★★★	★★★★
ハイブリさせる物質	不 要	不 要	プローブ

特徴1 通常のサーマルサイクラーで定量PCRが可能

本キットは目的遺伝子とハウスキーピング遺伝子を同時にPCRすることで簡易定量PCRを可能とするキットです。

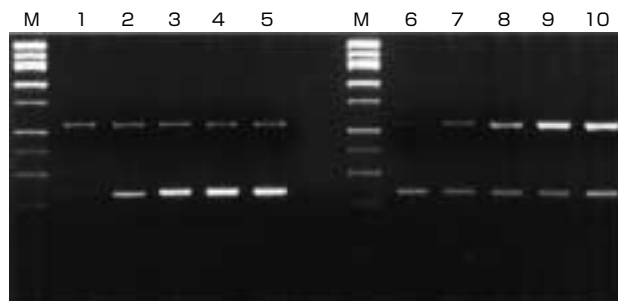
特徴2 簡 便

すでにPCR条件は最適化済みなので条件検討は不要、比べたいハウスキーピング遺伝子(18S RNA, GAPDH, L32, Phospholipase A2, Transferrin Receptorの5種から選択可能)を選ぶだけです。

特徴3 安 価

蛍光プローブを必要としませんので、ランニングコストが安く済みます。

※PCR用の酵素は、*Taq* DNA Polymeraseをご使用ください。
※反応スケールは50μlです。

同一チューブにおけるハウスキーピング遺伝子とTarget遺伝子の増幅結果

Lane M : 100bp DNA M.W. Marker
Lane 1- 5 : 10^3 housekeeping gene plus 10^2-10^6 target specific gene
Lane 6-10 : 10^3 target specific gene plus 10^2-10^6 housekeeping gene

上記写真より、増幅数が10^2～10^6の範囲ではinternalコントロールが、目的遺伝子の増幅を妨げていないことが分かります。これより、このキットを用いた場合、通常のPCRと同様に簡単で、1回のアッセイで多くの処理ができることを証明しています。

品名及び内容	包 装	保存温度	Code No.	価 格
Dual Quantitative RT-PCR(DQRT-PCR) Kit Premixed Target Specific Primers Premixed Housekeeping Gene Specific Primers Positive Controls Optimized Dual PCR Buffer(Enhancer、Stabilizer、dNTPs含む) ddH₂O 100bp DNA M.W. Marker Instruction Manual	100回用	-20℃	-	¥38,000

※本商品は2003年5月19日～7月25日のキャンペーン対象品です。詳細は本誌p3をご参照ください。
※対象商品の全リストは下記サイトでご確認の上、弊社代理店にご注文ください。
http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/camp/mbi50offcamp/mbi50off.html
☆rTaq DNA Polymerase(Code:TAP-201、包装:250U×1本、価格:¥25,000、他)、ホットスタート用anti-Taq high(Code:TCP-101、包装:100μl、価格:¥16,000)もございますので、是非ご利用ください。

GeneEraser™ siRNA Transfection Reagent

siRNA発現のための理想的な形質導入試薬です。

この試薬は、哺乳動物細胞におけるsiRNAの最適化された形質導入試薬です。低毒性でかつ高い導入効率を示し、あらゆる細胞系に対応します。

特徴 1 siRNA導入に最適

- 高い形質導入効率を保持しているため、非常に低濃度のsiRNAでも発現抑制が可能です。
- 広範囲の細胞に対応しています（表1、図1参照）。

特徴 2 細胞へのダメージを軽減

- 陽イオン性リポゾームをベースとした形質導入試薬ですので、低毒性であり細胞へのダメージが少ないです。

特徴 3 使いやすい

- 血清の添加や培地の交換も必要ありません。
- 培養液中での形質導入が可能です。

表1. 対応細胞

Mammalian Cells
Monkey Kidney（腎臓）SV40-Transformed
CHO-K1, Hamster Ovary（卵巣）
NIH／3T3, Mouse Embryo Fibroblast（胎児繊維芽細胞）
HT-29, Human Colon（結腸）Adenocarcinoma
A549, Human Lung Carcinoma（肺癌）
293, Human Kidney（腎臓）Transformed
HeLa, Human Cervical Carcinoma（子宮頸癌）

GeneEraser™　　試薬A　　試薬B

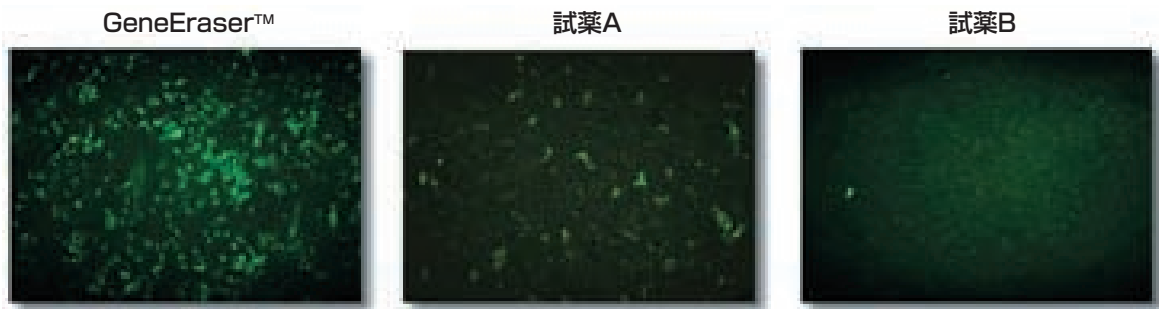



図1. 非常に高い形質導入効率

10μMのフルオレセインでラベルされたルシフェラーゼGL2 siRNAをHeLa細胞へ、GeneEraser™と他社導入試薬とを用いて、それぞれ導入しました。結果、試薬Aでは少し、試薬Bにおいてはほとんどその蛍光が見られないのに対し、GeneEraser™試薬は95～100%もの導入効率を保持していることが分かりました。

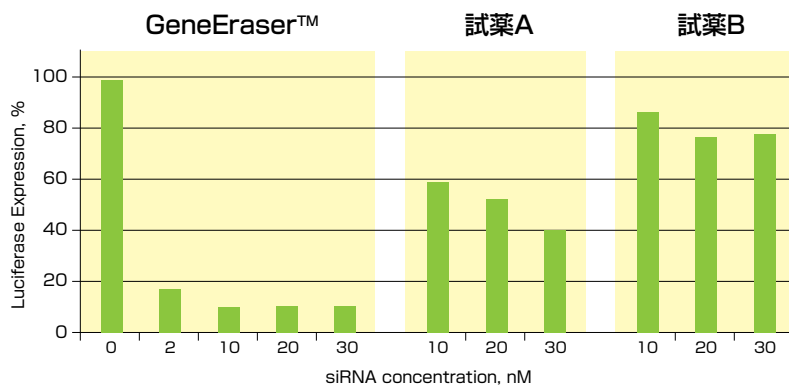



図2. ルシフェラーゼsiRNAの発現抑制効果

GeneJammer® transfection reagent（Stratagene製）を用いて、HeLa細胞にpGL2 luciferase reporter prasmidを導入し、細胞をプレートに癒着させました。その後、luciferase GL2 siRNAを、各形質導入試薬（2.5μl）を用いて導入しました。
導入から24時間後、細胞懸濁液を、ルシフェラーゼアッセイを行いました。
その結果、GeneEraser™ transfection reagentでは、83～90%もの高い発現抑制効果が認められました。その他では、試薬Aで40～60%、試薬Bではわずか13～22%でした。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
GeneEraser™ siRNA Transfection Reagent	1.0ml	4℃	SC204150	￥110,000
	0.4ml	4℃	SC204152	￥53,000

New Recombinant Cytokines
PEPROTECH社 New Cytokines

Cytokineの老舗「PEPROTECH社」の新しいラインナップが加わりました。

PEPROTECH社は、高品質のRecombinant Cytokineの製造・販売として定評のある会社です。TOYOBOは、1992年より日本の代理店としてPEPROTECH社の製品を取り扱って参りました。
今回は、約90品目の新しいCytokineが販売開始となりました。是非、ご利用ください。

品名及び内容	包装	Code No.	価格	包装	Code No.	価格
human 4-1BB (Receptor)	20μg	PT31015	¥39,000	5μg	PT31015L	¥13,000
human apo-SAA	500μg	PT30013	¥39,000	-	-	-
human Artemin	10μg	PT45017	¥39,000	2μg	PT45017L	¥13,000
human BCMA	20μg	PT31016	¥39,000	5μg	PT31016L	¥13,000
human BD-1 (36a.a.)	20μg	PT30051	¥39,000	5μg	PT30051L	¥13,000
human BD-1 (47a.a.)	20μg	PT30051A	¥39,000	5μg	PT30051AL	¥13,000
human BD-3	20μg	PT30052	¥39,000	5μg	PT30052L	¥13,000
human BMP-2	10μg	PT12002	¥39,000	2μg	PT12002L	¥13,000
human BMP-14/CDMP-1	10μg	PT12001	¥39,000	2μg	PT12001L	¥13,000
human Bone Morphogenetic Protein-7/OP-1	10μg	PT12003	¥39,000	2μg	PT12003L	¥13,000
human Bone Morphogenetic Protein-13/CDMP-2	10μg	PT12004	¥39,000	2μg	PT12004L	¥13,000
human BRAK (CCL6)	20μg	PT30050	¥39,000	5μg	PT30050L	¥13,000
human CTACK (CCL27)	20μg	PT30054	¥39,000	5μg	PT30054L	¥13,000
human CXCL16	25μg	PT30055	¥39,000	5μg	PT30055L	¥13,000
human EG-VEGF	10μg	PT10044	¥39,000	2μg	PT10044L	¥13,000
human Fas Ligand	10μg	PT31003	¥39,000	2μg	PT31003L	¥13,000
human FGF-20	15μg	PT10041	¥39,000	3μg	PT10041L	¥13,000
human gAcrp30/Adipolean	10μg	PT45021	¥39,000	2μg	PT45021L	¥13,000
human GROβ (CXCL12)	10μg	PT30039	¥39,000	2μg	PT30039L	¥13,000
human HGF	10μg	PT10039	¥39,000	2μg	PT10039L	¥13,000
human IFN-α	100μg	PT30002A	¥39,000	20μg	PT30002AL	¥13,000
human IFN-β	10μg	PT30002B	¥39,000	2μg	PT30002BL	¥13,000
human IFN-β (CHO)	10μg	PT30002BC	¥39,000	2μg	PT30002BCL	¥13,000
human IL-1RA	10μg	PT20001RA	¥39,000	-	-	-
human IL-1β	10μg	PT20001B	¥39,000	2μg	PT20001BL	¥13,000
human IL-16 (121 a.a.)	10μg	PT20016A	¥39,000	2μg	PT20016AL	¥13,000
human IL-19	10μg	PT20019	¥39,000	2μg	PT20019L	¥13,000
human IL-20	10μg	PT20020	¥39,000	2μg	PT20020L	¥13,000
human IL-22	10μg	PT20022	¥39,000	2μg	PT20022L	¥13,000
human Interleukin-13 Analog	10μg	PT20013A	¥39,000	2μg	PT20013AL	¥13,000
human Interleukin17D (IL-17D)	10μg	PT20027	¥39,000	2μg	PT20027L	¥13,000
human Interleukin17E (IL-17E)	10μg	PT20025	¥39,000	2μg	PT20025L	¥13,000
human Interleukin17F (IL-17F)	10μg	PT20024	¥39,000	2μg	PT20024L	¥13,000
human I-TAC (CXCL11)	20μg	PT30046	¥39,000	5μg	PT30046L	¥13,000
human LAG-1 (CCL4L1)	20μg	PT30058	¥39,000	5μg	PT30058L	¥13,000
human LD78β (CCL3L1)	20μg	PT30056	¥39,000	5μg	PT30056L	¥13,000
human MEC (CCL28)	20μg	PT30057	¥39,000	5μg	PT30057L	¥13,000
human Myostatin	10μg	PT12000	¥39,000	2μg	PT12000L	¥13,000

品 名 及 び 内 容	包 装	Code No.	価 格	包 装	Code No.	価 格
human NT-1/BCSF-3	10μg	PT45018	¥39,000	2μg	PT45018L	¥13,000
human Persephin	20μg	PT45012	¥39,000	5μg	PT45012L	¥13,000
human PF-4（CXCL4）	20μg	PT30016	¥39,000	5μg	PT30016L	¥13,000
human PTHrP	50μg	PT10009	¥39,000	10μg	PT10009L	¥13,000
human RELMβ	25μg	PT45022	¥39,000	5μg	PT45022L	¥13,000
human Resistin	25μg	PT45019	¥39,000	5μg	PT45019L	¥13,000
human sCD40Ligand/TRAP	50μg	PT31002	¥39,000	10μg	PT31002L	¥13,000
human sIL-4 Receptor	15μg	PT20004R	¥39,000	3μg	PT20004RL	¥13,000
human sIL-6 Receptor	20μg	PT20006R	¥39,000	5μg	PT20006RL	¥13,000
human soluble Fas Receptor	20μg	PT31020	¥39,000	5μg	PT31020L	¥13,000
human Sonic Hedgehog（Shh）	25μg	PT10045	¥39,000	5μg	PT10045L	¥13,000
human sRANKL	10μg	PT31001	¥39,000	2μg	PT31001L	¥13,000
human sRANKL（Receptor）	100μg	PT31008	¥39,000	20μg	PT31008L	¥13,000
human sTNF-receptor Type Ⅰ	20μg	PT31007	¥39,000	5μg	PT31007L	¥13,000
human sTRAIL Receptor-1（DR4）	50μg	PT31018	¥39,000	10μg	PT31018L	¥13,000
human sTRAIL Receptor-2（DR5）	50μg	PT31019	¥39,000	10μg	PT31019L	¥13,000
human TACI	20μg	PT31017	¥39,000	5μg	PT31017L	¥13,000
human TGF-β_2	5μg	PT10035	¥39,000	1μg	PT10035L	¥13,000
human TWEAK	10μg	PT31006	¥39,000	2μg	PT31006L	¥13,000
murine APRIL	20μg	PT31513	¥39,000	5μg	PT31513L	¥13,000
murine BLC/BCA-1（CXCL13）	20μg	PT25024	¥39,000	5μg	PT25024L	¥13,000
murine Cardiotrophin-1	10μg	PT25025	¥39,000	2μg	PT25025L	¥13,000
murine CTACK（CCL27）	20μg	PT25026	¥39,000	5μg	PT25026L	¥13,000
murine CXCL16	25μg	PT25028	¥39,000	5μg	PT25028L	¥13,000
murine Eotaxin-2（CCL24）	20μg	PT25022	¥39,000	5μg	PT25022L	¥13,000
murine Flt3-Ligand	10μg	PT25031	¥39,000	2μg	PT25031L	¥13,000
murine gAcrp30	25μg	PT45027	¥39,000	5μg	PT45027L	¥13,000
murine IL-1β	10μg	PT21111B	¥39,000	2μg	PT21111BL	¥13,000
murine IL-13	10μg	PT21013	¥39,000	2μg	PT21013L	¥13,000
murine IL-22	10μg	PT21022	¥39,000	2μg	PT21022L	¥13,000
murine I-TAC（CXCL11）	20μg	PT25029	¥39,000	5μg	PT25029L	¥13,000
murine LIGHT	20μg	PT31512	¥39,000	5μg	PT31512L	¥13,000
murine MCP-2（CCL8）	20μg	PT25014	¥39,000	5μg	PT25014L	¥13,000
murine M-CSF	10μg	PT31502	¥39,000	2μg	PT31502L	¥13,000
murine MEC（CCL28）	20μg	PT25030	¥39,000	5μg	PT25030L	¥13,000
murine MIP-3α（CCL20）	20μg	PT25027	¥39,000	5μg	PT25027L	¥13,000
murine RELMα	20μg	PT45026	¥39,000	5μg	PT45026L	¥13,000
murine Resistin	25μg	PT45028	¥39,000	5μg	PT45028L	¥13,000
murine SDF-1β（CXCL12）	10μg	PT25020B	¥39,000	2μg	PT25020BL	¥13,000
murine sRANKL	10μg	PT31511	¥39,000	2μg	PT31511L	¥13,000
murine TPO	10μg	PT31514	¥39,000	2μg	PT31514L	¥13,000
rat GM-CSF	10μg	PT40023	¥39,000	2μg	PT40023L	¥13,000
rat GROβ/MIP-2（CXCL12）	25μg	PT40011	¥39,000	5μg	PT40011L	¥13,000
rat IL-1α	10μg	PT40001A	¥39,000	2μg	PT40001AL	¥13,000
rat IL-2	20μg	PT40002	¥39,000	5μg	PT40002L	¥13,000
rat IL-13	10μg	PT40016	¥39,000	2μg	PT40016L	¥13,000
rat Leptin	1000μg	PT40021	¥39,000	200μg	PT40021L	¥13,000
rat Macrophage Inflammatory Protein-1 beta（CCL4）	20μg	PT40009	¥39,000	5μg	PT40009L	¥13,000
rat SCF	10μg	PT40022	¥39,000	2μg	PT40022L	¥13,000

High-Fidelity RT-PCRキット “*ReverTra -Plus-*™” を用いた遺伝子増幅

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　北林 雅夫

はじめに

近年、ゲノムプロジェクト等により、数多くの遺伝子の塩基配列が解明されてきました。しかし、その遺伝子の多くは依然機能が十分に解明されておらず、個々の遺伝子をクローニングして、機能解析を行うといった常套的なアプローチが重要になっています。

現在、遺伝子クローニングの多くにRT-PCR法が用いられています。RT-PCRはRNAからcDNAを合成する逆転写反応と、このcDNAを増幅するPCRから構成されています。このPCRにて誤ったDNA配列が増幅された場合、目的遺伝子が本来有しているはずの機能を損なう危険性があります。そこで、正確性の高い High-Fidelity PCR酵素が利用されています。

私達は、RNAから効率的にcDNAを合成する逆転写酵素 “ReverTra Ace®” と、High-Fidelity PCR酵素の中でも特に正確性の優れた “KOD -Plus-” を組合わせて、正確に効率よく遺伝子を増幅できるRT-PCRキット “*ReverTra -Plus-*™” を開発しました。本キットはヒトtotal RNAを鋳型にしたRT-PCRにて10kb以上の増幅が可能であり、増幅されたDNA配列は今まで市販されてきたHigh Fidelity RT-PCRキットと比べて約10倍の正確さを保持しています。

今回は、この “*ReverTra -Plus-*™” の増幅性能を他社のHigh Fidelity RT-PCRキットとの比較データを交えてご紹介します。

RT primer

本キットにはoligo(dT)$_{20}$ primer、random primer、gene specific primerの3種類のRT primerがございます。

oligo(dT)$_{20}$ primer、random primerを使用した場合、PCRにて様々な遺伝子の増幅が可能となります。鋳型としてポリA-tailを持つRNAを使用する場合は、oligo(dT)$_{20}$ primerの使用をお勧めします。ポリA-tailがない5kb以下のターゲットに対してはrandom primerをご使用ください。gene specific primerを使用した場合、そのRT反応液は単一遺伝子の増幅にしか利用できません。しかし、RT-PCRの増幅感度を高めるためには、有効なprimerとなります。用途に合わせてRT primerを選択してください。

方　法

1.Oligo(dT)$_{20}$ primerの使用

反応液は各キット添付の取扱い説明書に従い、調製しました。

ヒトHeLa細胞由来total RNA 1μgを鋳型として、oligo(dT)$_{20}$をRT primerとして50pmol使用しました。

RT反応条件

65℃, 5min → 急冷*1
⇩ ←RT反応液
42(50*2)℃, 60min.
85℃, 5min.
4℃保存.

PCRサイクル条件

94℃, 2min.
98℃,10sec. ┐
60℃,30sec. │35 cycles
68℃, Xmin./kb ┘

ReverTra -Plus-™
A、B、D社Kit:Xmin. = 1min.
C社Kit:Xmin. = 3 min.

2.Gene specific primerの使用

先程と同様、反応液は各キット添付の取扱い説明書に従い、調製しました。

ヒト筋肉由来total RNA 1μgを鋳型として、gene specific primerをRT primerとして5pmol使用しました。

RT反応条件

65℃, 5min → 急冷*1
⇩ ←RT反応液
42(50*2)℃,60min.
85℃,5min.
4℃保存.

PCRサイクル条件

ターゲット:DMD 4.1, 5.9kb (dystrophin)
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ┐
55℃, 30sec. │35 cycles
68℃, 6min. ┘

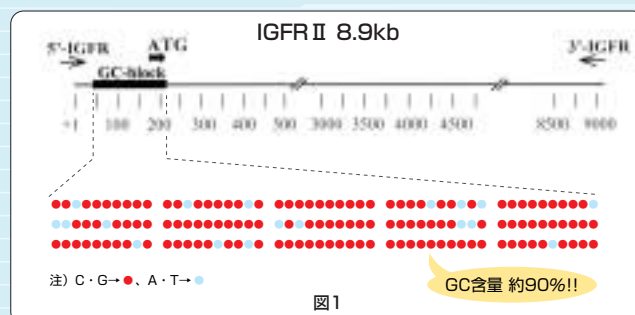
ターゲット:DMD 7.7kb (dystrophin)
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ┐
65℃, 30sec. │35 cycles
68℃, 7.5min. ┘

ターゲット:DMD 9.5kb (dystrophin)
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ┐
60℃, 30sec. │35 cycles
68℃, 9.5min. ┘

3.GC rich、long targetに対する増幅効率を調査

Insulin-like growth factorⅡ receptor(IGFRⅡ)遺伝子8.9kbをターゲットとした RT-PCRを行いました。IGFRⅡ遺伝子は、その5'端付近にGC-blockと呼ばれるGC含量が約90%ある領域が存在します(図1)。

先程と同様、反応液は各キット添付の取扱い説明書に従い、調製しました。ヒトHeLa細胞由来total RNA 1μgを鋳型として、oligo(dT)$_{20}$ primerをRT primerとして50pmol使用しました。

図1

PCRサイクル条件（Stepdown PCR）

94℃, 2min.
98℃,10sec. ← 5 cycles
74℃, 9min.
98℃,10sec. ← 5 cycles
72℃, 9min.
98℃,10sec. ← 5 cycles
70℃, 9min.
98℃,10sec. ← 25 cycles
68℃, 9min.
68℃, 7min.

＊1:RT反応に先立ち、鋳型RNAとRT primerの熱変性を行ないます。このステップがRT伸長反応を高める上で重要となります。
＊2:反応温度（サイクル）条件は、各社商品の取扱い説明書に従いました。
＊3:C、D社キットは、方法2及び3ではほとんど増幅しなかったため、比較は行いませんでした。

結果及び考察

1．*ReverTra -Plus-*™を用いた場合、CBP（CREB-binding protein）2.2、4.4、7.3kbのいずれのターゲットも増幅することができました（図2）。oligo(dT)$_{20}$ primerを使用した場合、短いターゲットはもちろん、5kb以上の長鎖ターゲットの増幅にも優れています。

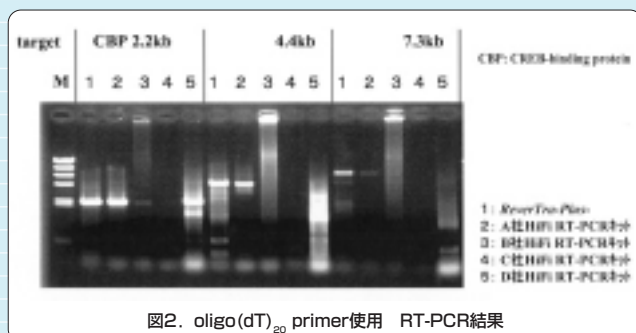



図2．oligo(dT)$_{20}$ primer使用　RT-PCR結果

2．このターゲットはRT primerとしてoligo(dT)$_{20}$ primerを使用した場合、十分に増幅することができませんでした。そこで、増幅感度を高めるためにgene specific primerを使用しました。*ReverTra -Plus-*™を用いた場合、DMD 4.1、5.9、7.7、9.5kbのいずれのターゲットも増幅することができました（図3）。なお、gene specific primerを使用する場合、PCR primerとは異なるターゲット配列よりも下流に位置するRT primerを使用する方がきれいに増幅することができました。

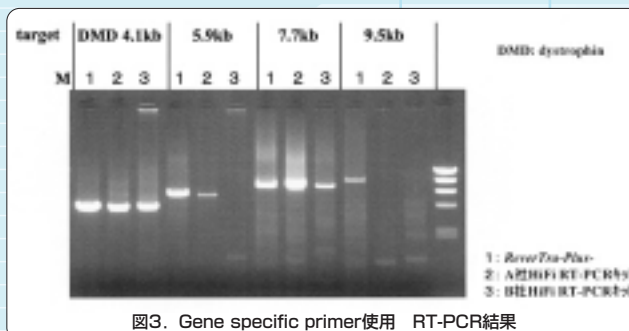



図3．Gene specific primer使用　RT-PCR結果

3．サイクル条件に2step PCR、3step PCRを採用してPCRを行なったところ、多数のエキストラバンドが認められました。そこで、徐々にアニーリング&伸長温度を下げていくStepdown PCRを採用しました。他社HiFi RT-PCRキットを用いた場合、GC-blockを乗り越えた伸長は不可能でした。一方、弊社*ReverTra -Plus-*™を用いた場合、GC-blockを乗り越えたターゲットの増幅が可能になりました（図4）。

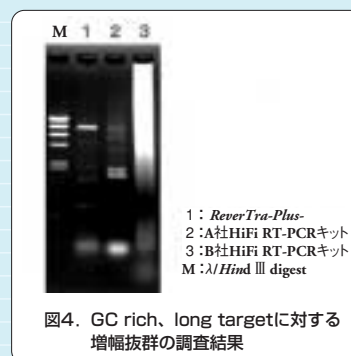



図4．GC rich、long targetに対する増幅抜群の調査結果

ReverTra -Plus-™は、RT-PCR性能にこだわり開発されました。皆様の研究に必ず貢献できるものと思います。無償サンプルがございます。是非一度、この性能をお確かめください。

参考文献

1．Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
2．Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem. Tokyo*, **125**, 983-986 (1999)
3．Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem. Tokyo*, **126**, 762-768 (1999)
4．Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., Kai. Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-477 (2001)

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性RT-PCR Kit **ReverTra -Plus-™**	100回用	-20℃	PCR-501	¥70,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
逆転写酵素 **ReverTra Ace®**	10,000U×1本	-20℃	TRT-101	¥15,000
	50,000U×1本	-20℃	TRT-102	¥60,000
First Strand RT-PCR Kit **ReverTra Ace-α-®**	100回用	-20℃	FSK-101	¥53,000
High Fidelity PCR酵素 **KOD -Plus-**	200U×1本	-20℃	KOD-201	¥30,000
	200U×5本	-20℃	KOD-202	¥120,000
	200U×11本	-20℃	KOD-203	¥230,000
Oligo(dT)$_{20}$	1nmole	-20℃	FSK-201	¥8,000
Random Primer(9mer)	2.5nmoles	-20℃	FSK-301	¥8,000

表面プラズモン共鳴イメージング法による抗体スクリーニング

東洋紡績（株）　バイオ21プロジェクト推進室　　京　基樹

はじめに

ハイブリドーマ細胞の樹立に際して、優れた抗体を産生する株を選択するため、各々のクローンにより産生されるモノクローナル抗体をスクリーニングする必要があります。反応性を指標とするスクリーニング方法としては一般的にELISA法が使われていますが、操作が煩雑となる問題点があります。

表面プラズモン共鳴（SPR）法は光学的な検出方法であるため、抗原をラベル分子によって標識する必要がなく、抗原そのものと抗体の結合特性を評価することが可能です。具体的には、金属薄膜上に抗体を固定化し、抗原の結合による表面近傍の屈折率変化をSPR角の変化もしくは、反射光強度の変化で検出できます。従来の市販されているSPR装置では、測定点は最大4点までであり、多量のスクリーニングには適していませんでした。

今回、MultiSPRinter™で採用したSPRイメージング法では、平行光束をチップ全面に照射し、その反射光をCCDカメラで撮影することで、広範囲のSPR変化が観察可能となりました（図1）。さらに、自動スポッターを用いることで、チップに多種類の生体分子を簡便に固定化することができます。今回はモノクローナル抗体を固定化したチップを用意し、SPRイメージングにより抗原の結合を観察し、得られたデータから結合平衡定数を算出することにより、抗体の評価を試みました。本稿ではMultiSPRinter™の具体的な使用方法や実施例について紹介します。

方　　法

1．チップ上の官能基の活性化

MultiSPRinter™ COOHチップに300μlの0.2M EDC／0.05M NHS PBS（-）溶液を1時間反応させ、COOH基を活性化します。

EDC：1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（水溶性カルボジイミド）
NHS：N-ヒドロキシスクシンイミド
PBS（-）：20mMリン酸緩衝液、150mM NaCL、pH7.4

2．チップへの抗体溶液のスポッティング

チップを水洗後、空気噴霧により乾燥させ、MultiSPRinter™自動スポッターに装着します。13種類の抗ヤギIgGモノクローナル抗体を100μg/mlの濃度に調整し（リン酸緩衝液）、10μlを96穴プレートに用意します。自動スポッターの内部湿度を78%に保ち、n=2でスポッティングを行いました。スポッティング終了後、加湿チャンバーに移し、2時間放置して固定化しました。

3．活性基のブロッキング

反応終了後のチップを蒸留水で数回洗浄した上で水を取り除き、分子量2,000のアミノ基末端ポリエチレングリコール水溶液（2mg/ml、pH8.5）300μlをチップ上に注ぎ、残存するスクシンイミド基にポリエチレングリコールを反応させ、ブロッキングを行いました。表面固定化の反応スキームは図2に示しました。

4．SPRイメージング測定

チップを水洗後、空気噴霧により乾燥させ、MultiSPRinter™ SPR装置にセットしました。緩衝液を通液し、安定化させた後、抗原であるヤギIgGを1μg/mlから8μg/mlまで濃度（C）を段階的に倍増させ、各々の濃度における平衡時のシグナル（Req）を得ました。Req/CとCをプロットし（スキャッチャードプロット）、その傾きから結合平衡定数を算出しました。

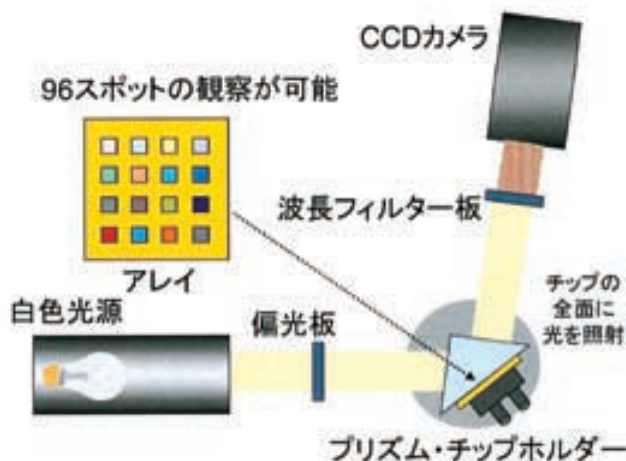



図1　SPR イメージング法の概念図

平行光とした偏光光束をチップ全面に照射し、その反射光をCCDカメラでSPR像として撮影する。SPR像の調べたい部分の反射光強度の変化を解析することで、複数の物質の相互作用解析が可能となる。

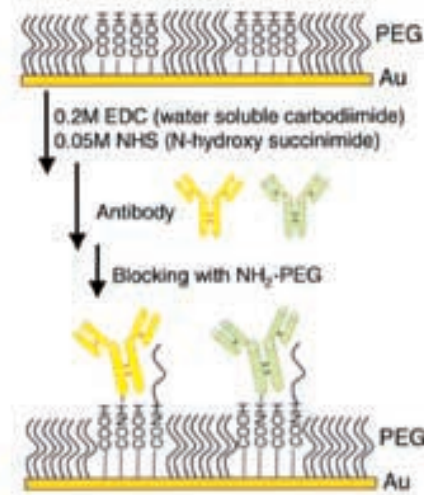



図2　抗体表面固定化の反応式

結果及び考察

抗ヤギIgGモノクローナル抗体13種類を上記方法に従ってチップ上に固定化しました。ヤギIgGとの結合特性を調べるため、段階的に濃度を上げ、Reqを求めました。その過程における13点および、抗体を固定化していないバックグラウンドのシグナル変化を図3に示します。バックグラウンドには全く抗原が吸着していないことが確認できます。13種類のモノクローナル抗体に関して、求めたReqと濃度Cからスキャッチャードプロットを行った結果を図4に示します。濃度1～8μg/mlの間でほぼ直線関係が得られました。

スキャッチャードプロットの傾きから結合平衡定数を求めた結果を表1に記します。ここでは、シグナルが低いために相関係数が0.8未満となったデータは省きました。抗体K、H、Bの順にアフィニティが高いことを明らかとしました。このようにSPRイメージング法により、多量のサンプルの結合特性を簡便に観察、評価することができました。

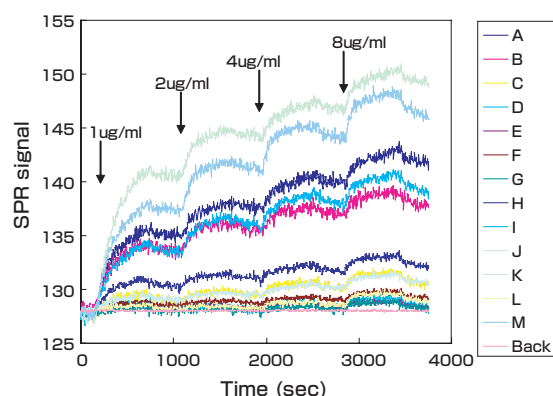



図3　ヤギIgGの濃度を段階的に増加させた場合のSPRシグナル変化

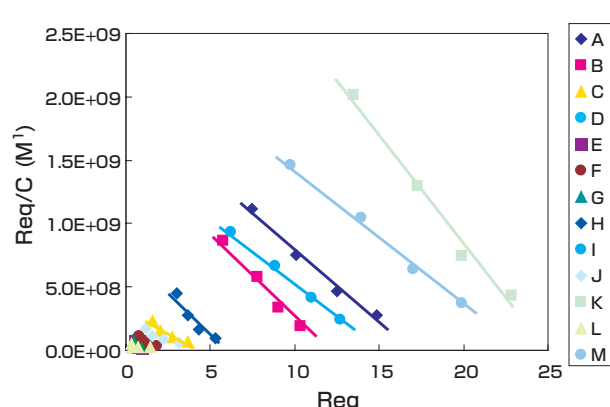



図4　抗ヤギIgGモノクローナル抗体13種類のスキャッチャードプロット

表1　スキャッチャードプロットから求めた結合平衡定数

	A	B	C	D	E	F	G
K_A (M^{-1})	1.2×10^8	**1.5×10^8**	8.2×10^7	-	-	8.3×10^7	-

	H	I	J	K	L	M
K_A (M^{-1})	**1.6×10^8**	1.1×10^8	6.4×10^7	**1.8×10^8**	4.4×10^7	-

参考文献

1）Nelson, B. P.; Frutos, A. G.; Brockman, J. M.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **71**(18) 3928-3934 (1999)
2）Brockman, J. M., Nelson, B. P. and Corn, R. M., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **51**, 41-63 (2000)

品 名 及 び 内 容	包　装	Code No.	価　　格
Surface Plasmon Resonance Imaging System **MultiSPRinter™フルシステム** （SPR イメージング装置と自動スポッター装置のセット）	1式	SPR-101	¥16,000,000 NEW
MultiSPRinter™ SPR イメージング装置	1台	SPR-102	¥12,000,000
MultiSPRinter™ 自動スポッター装置	1台	SPR-103	¥4,500,000

品 名 及 び 内 容	包　装	保存温度	Code No.	価　　格
MultiSPRinter™ NH_2 チップ	1個	4℃	SPR-201	¥20,000
MultiSPRinter™ COOH チップ	1個	4℃	SPR-202	¥20,000
MultiSPRinter™ 自動スポッター用96穴プレート	20回用	室温	SPR-301	¥8,000

Dioxin ELISA Kit -For Gas-/-For Ash- を用いた環境試料の測定

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 西井 重明、（株）タクマ 環境エネルギー研究所 藤平弘樹

はじめに

2000年1月にダイオキシン類対策特別措置法が施行され、昨年12月から同法の規制が本格的に実施されました。同法では、地方自治体や事業者に年1回以上のダイオキシン類の測定を義務付けており、その測定には高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（HRGC/HRMS）が用いられています。HRGC/HRMSを用いた測定法（公定法）は、その装置が高価なだけでなく、分析技術の習熟が困難で、測定結果が得られるまでに長時間（約1ヶ月）を要し、1検体当たりの測定コストが高いといった問題点が指摘されています。したがって、公定法によるダイオキシン類の測定を頻繁に行い、施設の日常的な運転管理や、汚染土壌のスクリーニングを行うことは困難です。

そこで東洋紡と㈱タクマは、短時間で多検体分析が可能で、かつ、1検体当たりの分析費用が安価な測定法として酵素免疫測定法（ELISA法:**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno-**S**orbent **A**ssay）に着目し、迅速・簡易・安価にダイオキシン類濃度の測定が可能な測定キットを開発しました。本稿では、本キットの特徴と公定法との相関性について報告します。

キットの特徴

ELISA法で試料中のダイオキシン類濃度（TEQ値）を測定するには、抗ダイオキシン類抗体がTEQ値と相関性の高いダイオキシン類異性体を認識する必要があります。

我々は、公定法で測定したデータを用いて、試料中の各ダイオキシン類異性体濃度とTEQ値との相関性について検討したところ、排ガス試料、灰試料および土壌試料において、五塩素化および六塩素化のジベンゾフラン濃度とTEQ値との相関性が高いことを確認しました。この検討より、試料中の五塩素化および六塩素化ジベンゾフランと特異的に結合する抗ダイオキシン類抗体を開発し、公定法で測定したTEQ値と相関性の高いELISA系の構築に成功しました。

また一般的に検量線作成用の標準物質には毒性の高い2,3,7,8-TeCDDが用いられていますが、本キットでは、新たに開発したTCP-グリシルグリシンを検量線作成用標準物質として用いることで、毒性の高いダイオキシン標準物質を不要とし、その結果、測定者の安全性が大幅に向上しました。TCP-グリシルグリシンとは、2,4,5-トリクロロフェノール誘導体にアミノ酸の一種であるグリシンのジペプチド体を結合させた化合物であり、TEQ値の指標物質として期待されている2,3,4,7,8-PeCDFより約100倍反応性が劣るものの、ダイオキシンと同様の検量曲線を作成することができます（図1）。

【図1】TCP誘導体とダイオキシン類との標準曲線比較

※B／Bo(%)＝各標準物質濃度における吸光度／標準物質ゼロの時の吸光度×100

方　法

同一の排ガス、飛灰および土壌試料を用いて以下の方法により公定法とELISA法による測定値の相関性を検討しました。排ガス試料はJIS法（K0311）に準拠して採取し、排ガス採取後の固相部（円筒ろ紙+XAD-2樹脂）、飛灰および土壌試料のダイオキシン類の抽出にはソックスレー抽出器（溶媒:トルエン）を用いました。その粗抽出液を着色が無くなるまで硫酸処理し、更に多層シリカゲルカラム処理したものをジメチルスルホキシド（DMSO）溶液に転溶し、キット添付の取扱説明書に従ってELISA測定を実施しました。なお公定法では多層シリカゲルカラムからの溶出液の一部を更に活性炭カラム処理し、デカンに転溶したものをHRGC/HRMS測定に用いました。

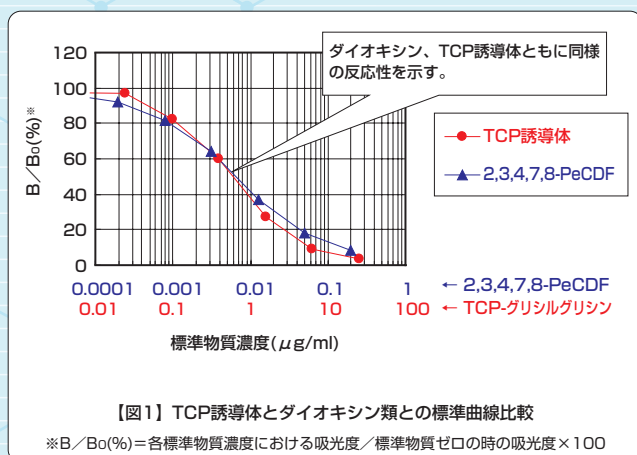
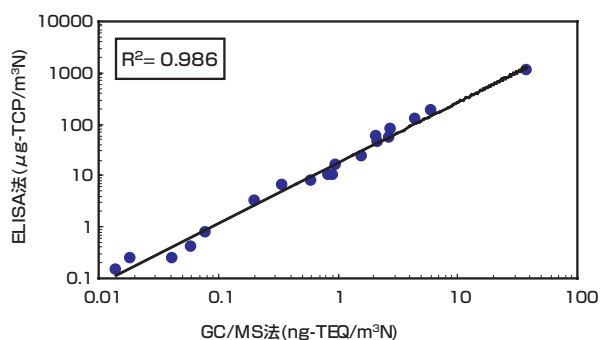
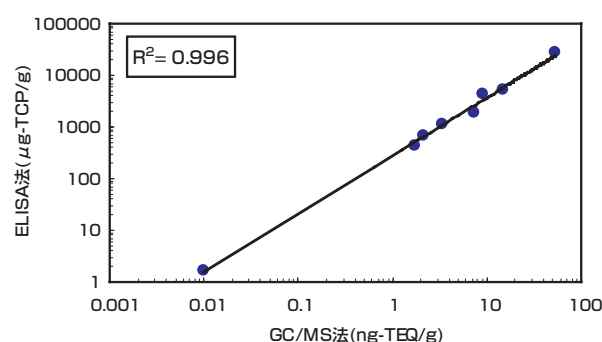
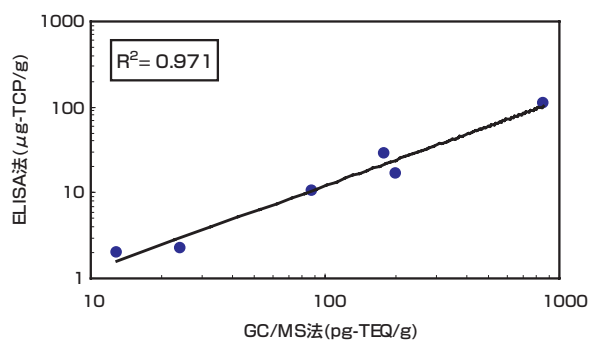
結　果

排ガス試料19検体をELISA法と公定法でそれぞれ測定し、相関分析を行った結果、相関係数0.98の有意な正の相関が認められました。同様に飛灰試料8検体および土壌試料6検体の相関分析を行った結果、それぞれ相関係数0.99および0.97の有意な正の相関関係が認められました。以上の結果から、ELISA法による測定値からTEQの算出が可能であることが立証されました（図2、3、4）。

また実際に焼却施設の燃焼管理に本測定法を適用した実施例を表1に示します。データは各プラントの最終出口（煙突）で排ガス中のダイオキシン類を公定法とELISA法により測定した結果ですが、ELISA法での測定結果は同一の試料を公定法で測定した結果と非常に近く、新設施設の排ガスに係る排出基準値（0.1ng-TEQ/m^3N）レベルのモニタリングが十分可能でした。

ダイオキシン類の簡易測定法は日本では未だ公定法として承認されていませんが、近年、簡易分析法のニーズや関心の高まりと共に、各省庁および様々な研究機関で簡易測定法の評価検討が行われています。

我々が開発したELISA法は安価で多検体処理が可能であるため、燃焼施設の日常管理や汚染された土壌のスクリーニングに適したものであり、焼却施設の性能評価試験や排ガス処理装置の性能確認試験の場合等、早急にダイオキシン類濃度が知りたい場合にも本測定法の適用が有効です。

なお本キットを用いた環境試料の受託分析を（株）環境ソルテックにて承っております。ご興味のある方は（株）環境ソルテック（Tel:0794-43-6508）までお問い合わせください。

【図2】排ガス試料における公定法との相関

【図3】飛灰試料中における公定法との相関

【図4】土壌試料における公定法との相関

【表1】

	ELISA法	公定法
A 施 設	0.041	0.025
B 施 設	0.022	0.019
C 施 設	0.14	0.10
D 施 設	0.018	0.018
E 施 設	0.013	0.030
F 施 設	0.019	0.019
G 施 設	<0.010	0.00085

単位:ng-TEQ/m³N

	品名及び内容	包 装	保存温度	Code No.	価 格
危	**Dioxin ELISA Kit For Gas(排ガス測定用)**	1プレート(96穴)	2~8℃	DXN-101	¥200,000
危	**Dioxin ELISA Kit For Ash(飛灰・土壌測定用)**	1プレート(96穴)	2~8℃	DXN-201	¥200,000

キットの構成

パーツ	包 装	保存温度
抗原固相プレート	96well×1	2~8℃
TCP濃縮標準溶液	1ml×1	
試料希釈用DMSO	8ml×1	
一次免疫反応用緩衝液	8ml×1	
一次抗体溶液	10ml×1	
二次抗体濃縮溶液(100倍濃縮液)	0.15ml×1	

パーツ	包 装	保存温度
二次抗体希釈用緩衝液	12ml×1	2~8℃
発色基質液(TMB)	12ml×1	
反応停止液(0.5mol/l 硫酸)	12ml×1	
濃縮洗浄液(10倍濃縮液)	50ml×1	
プレート密閉用シール	1枚	
取り扱い説明書	1部	

関連商品

	品名及び内容	包 装	保存温度	Code No.	価 格
危	**Ligand Screening System -Androgen Receptor-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ARA-101	¥88,000
危	**Ligand Screening System -Estrogen Receptor α-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ERA-101	¥88,000
危	**Ligand Screening System -Estrogen Receptor β-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ERB-101	¥88,000
	ビスフェノールA測定ELISAキット	1プレート(96穴)	4℃	BEK-101	¥65,000

ΔTth® DNA Polymeraseを用いた新しい核酸検出法
-*in situ* hybridization AT-tailing(ISH-AT)法-によるホルマリン固定パラフィン包埋組織標本からのHIV-RNAの検出

国立感染症研究所　感染病理部　中島 典子

はじめに

in situ hybridization（ISH）法は組織切片上で、目的の核酸の局在を調べる方法です。いろいろな条件下で固定・保存されている組織標本中に残存する標的核酸をいかに高感度かつ特異的に検出できるかがポイントとなります。筆者らは高感度で特異性に優れた新しいISH法である*in situ* hybridization AT-tailing（ISH-AT）法を開発しました。この方法では、標的核酸と相補的なオリゴヌクレオチド（40塩基）の5'末にBiotin 1分子、3'末にアデニン、チミンの繰り返し配列ATAT...AT=（AT）$_{10}$が結合した合成オリゴプローブを用います。ハイブリダイゼーション後、強力に洗浄し、（AT）$_{10}$部分をprimer/ templateとしてΔTth® DNA PolymeraseによりdATP、dTTPとともにBiotin-16-dUTPを取り込ませながら伸長させます。その結果、標的核酸が存在する部位だけが特異的に多量のBiotinで標識されることになります。筆者らはこのBiotin標識部位をTyramide signal amplification（TSA）法で検出することでホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織切片上で従来法では検出できなかったHIV（ヒト免疫不全ウイルス）-RNAを検出しました。

方　法

■プローブ

検出したい核酸（RNA、DNA）の塩基配列の情報だけから合成委託できます。標的核酸と相補的なhybridization部分（40塩基長，GC%が約60%以上で高Tm値であることが必要）と3'末のアデニン、チミンの繰り返し配列ATAT...AT ＝（AT）$_{10}$（AT tailing部分）からなります。5'末にBiotin 1分子をあらかじめ結合しておきます（図1）。BiotinをTSA法で検出する際はプローブ濃度を0.01 pmol/μlに調整しておきます。

【図1】

■組織標本の前処理

ここではホルマリン固定パラフィン包埋剖検組織切片について述べます。細胞標本や凍結切片に関しては、前処理の至適条件が異なってきます。

脱パラ、水和後、抗原賦活用緩衝液（target retrieval solution buffer）に浸し、オートクレーブ中で95度、40分処理します。室温に戻ってからDEPC水で洗浄後、37度にあらかじめ暖めておいたプロテイナーゼK（0.1-1.0 μg/ml in PK buffer）を滴下し、37度のホットプレート上で15分反応させます。その後0.2%グリシン－トリスとDEPC水で洗浄します（図2,3）。

■Hybridization

ISH-AT用のバッファー（HybrAT buffer）の組成を図3に示します。Pre- hybridization後、加熱処理したプローブ（hybridization solution）を切片上に滴下し、カーバーグラスをのせ、湿潤箱に入れて50度でオーバーナイト反応させます。

■AT-tailing反応

強力に洗浄したあと（図2、13-15）切片周囲をふきとり、切片を囲むようにEasiSealを貼り付けます。ΔTth® bufferを周囲にあふれないように添加し、カバーシールをせずに60度のホットプレートに10分（10分以上放置すると蒸発消失するので注意）のせます。この間にAT-tailing反応液（図3）を準備します。10分経過したらまずΔTth® bufferを捨て、EasiSealのtop liner（紙質）をとってからAT-tailing反応液を加え、空気が入らないようにカバーシールをつけます。AT-tailing反応は60度のホットプレート上で30分行います。

■内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害とブロッキング

0.3%過酸化水素水/メタノールで30分処理後ブロッキングします（図2、19-22）。

■Tyramide シグナル増幅法

ABC（avidin-biotin complex）法よりも感度が優れたシグナル増幅系であるTSA法を用いました。TSA法は非常に感度がよくノイズが生じやすいため、プローブの濃度を下げ、hybridization後の洗浄の条件を厳しく設定しています。TSA法はDACO社のCSA systemに従い、最終的にDAB染色ないし蛍光染色しました（ISH-AT-CSA法）。

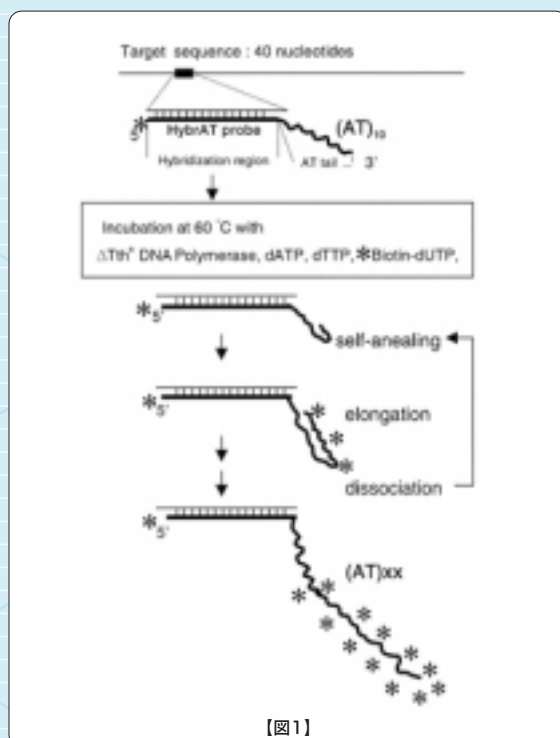



図2　*In situ* HybrAT-tailing Method

Step		Temp.	Time
1. 脱パラ			
2. Target retrieval solution		95度	40分
3. Cooled to RT			
4. DEPC-DW			
5. Proteinase K (0.1～1 μg/ml) in PK buffer		37度	15分
6. 0.2% glycine-Tris pH 7.6	x2		3分
7. DEPC-DW	x2		3分
8. 100% ethanol and air-dried			
9. Prehybridization with HybrAT buffer		37度	30分
10. Heated the hybridization solution		95度	5分
then　on ice			
12. Hybridization		50度	O/N
13. Washed in 0.1xSSC	x2	55度	15分
14. Washed in 0.01xSSC	x2	55度	15分
15. rinced in TBS			
16. Attached Hybaid EasiSeal to the slides			
17. Add 300 μl of ΔTth buffer		60度	10分
18. 100 μl of AT 伸長反応液と置換		60度	10分
19. TBS (0.1M, pH7.6)			
20. 0.3%H_2O_2 in methanol		室温	30分
21. TBS wash	x2		
22. 4×Blockace/TBS		室温 > 60 分 or 4度 O/N	
23. CSA法			

図3　Reagents

1. PK buffer : 0.1M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, pH 8.0

2. HybrAT buffer

50 ml

Reagents	Recipe	Final concentration
deionized formamide	5ml	10%
20×SSC	5ml	2×
100×Denhalt's	0.5ml	1×
1N NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	2.5ml	50mM
200 mM EDTA	0.25ml	1mM
10 mg/ml tRNA	2.5ml	500 μg/ml
DDW	34.25ml	

3. Hybridization solution

0.01pmol/μl probe	4 μl
ssDNA (10 mg/ml)	2 μl
HybrAT buffer	34 μl / 40 μl = 1section

4. AT tailing reaction mixture (100 μl per 1 section)

ΔTth buffer (10×conc.)	50 μl
#dNTP mixture	50 μl
ΔTth DNA Polymerase	5 μl
DDW	395 μl / 500 μl = 5sections

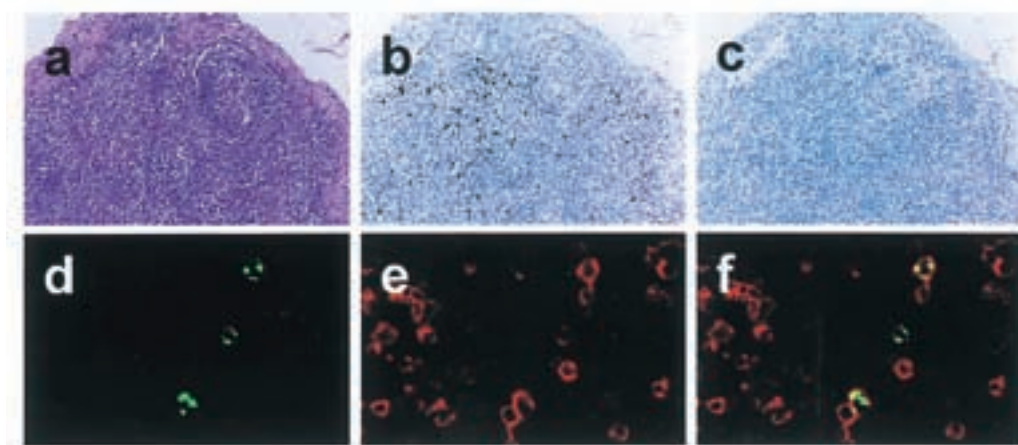
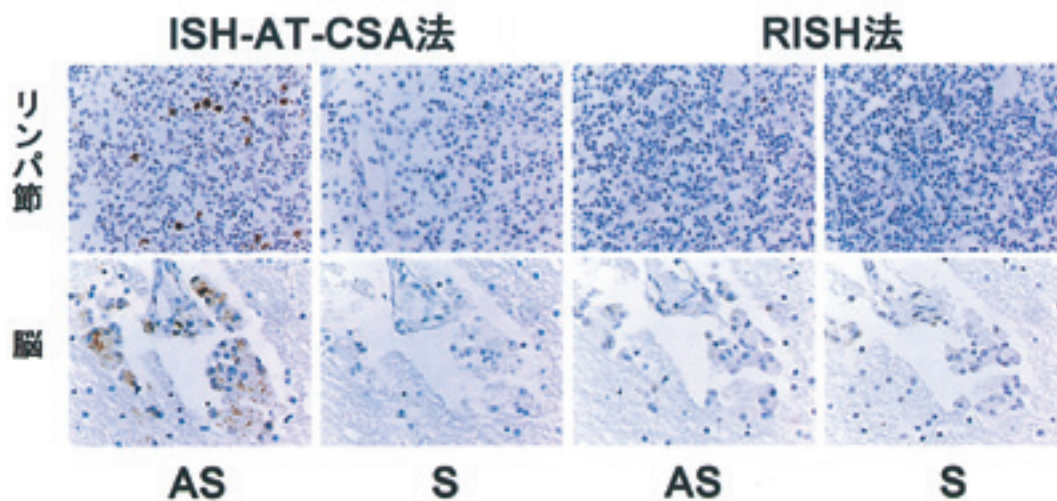
 # dNTP mixture

dATP (100 mM)	10 μl
dTTP (100 mM)	10 μl
Biotin-16 dUTP (1mM)	50 μl
DDW	430 μl / 500 μl

5. TBST : 0.05M Tris-HCl, pH7.8, 0.3M NaCl, 0.1%Tween20

結果及び考察

対象として小児エイズ剖検リンパ節及び脳のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用いました。対象リンパ節の濾胞は組織学的に萎縮傾向（図4、a）にあり、ISH-AT-CSA法により濾胞間に優位にHIV-RNA陽性細胞が検出されました（図4　b:Anti-sense probe、c:Sense-probe）。図4のdは蛍光ISH-AT-CSA法でHIV-RNAをAlexa Fluor 488（緑）で染色したものです。同じ切片を、T細胞マーカーであるCD3抗体およびAlexa Fluor 568（赤）で免疫染色し（図4、e）、重ね合わせる（merge）と、HIV-RNA陽性細胞は主にCD3陽性細胞であることがわかりました（図4、f）。

従来のISH法の中で最も感度が良いとされているRNAプローブを用いたISH法、RNA-ISH（RISH）法とISH-AT-CSA法を比較しました（図5）。リンパ節標本および脳標本ともに従来法では検出できなかったHIV-RNAがISH-AT-CSA法では検出可能であることがわかりました。

【図4】

【図5】

参考文献

1) Nakajima N., Ionescu P., Sato Y., Hashimoto M., Kuroita T., Takahashi H., Yoshikura H., and Sata T., *Am J Pathol*, **162**: 381-389 (2003)
2) Hanaki K., Nishihara T., Odawara T., Nakajima N., Yamamoto K., and Yoshikura H., *Biotechniques*, **31**: 734-738 (2001)
3) Nakajima N., Sata T., Hanaki K., Kurata K., and Yoshikura H., *J Virol Methods*, **81**: 169-177 (1999)
4) Nakajima N., Hanaki K., Shimizu YK., Ohnishi S., Gunji T., Nakajima A., Nozaki C., Mizuno K., Odawara T., and Yoshikura H., *Biochem Biophys Res Commun*, **248**:613-620 (1998)
5) Hanaki K., Odawara T., Nakajima N., Shimizu YK., Nozaki C., Mizuno K., Muramatsu T., Kuchino Y., and Yoshikura H., *Biochem Biophys Res Commun*, **244**: 210-219 (1998)
6) Hanaki K., Odawara T., Muramatsu T., Kuchino Y., Masuda M., Yamamoto K., Nozaki C., MizunoK., and Yoshikura H., *Biochem Biophys Res Commun*, **238**: 113-118 (1997)
7) 特開平 11-75880「オリゴヌクレオチドの標識方法およびその利用」財団法人化学及血清療法研究所

品 名 及 び 内 容	包　装	Code No.	価　格
ΔTth® DNA Polymerase (5U/μl)	500U×1本	TTH-201	¥30,000
ΔTth® DNA Polymerase (5U/μl)	500U×5本	TTH-202	¥120,000

一口メモ

ΔTth® DNA Polymerase

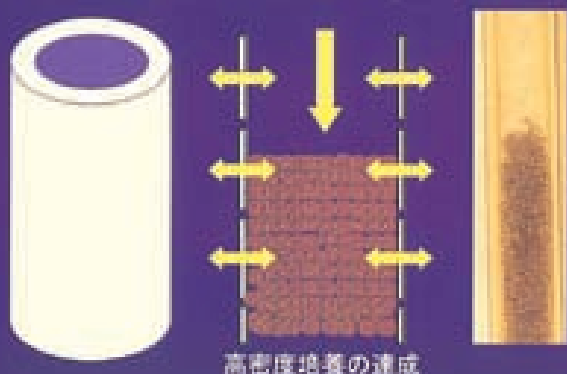
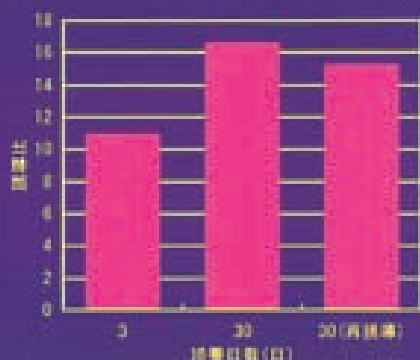
本酵素は、高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来の耐熱性DNA Polymeraseを遺伝子工学的に改変し、シーケンスにおいてラベルの入ったヌクレオチドの削除による検出感度の低下の原因や、シーケンス産物の削除がエキストラバンドの原因になる5'→3' Exonuclease活性を欠失させております。
これにより、本酵素は、エキストラバンドの少ない明瞭な結果を得ることができるダイデオキシ法シーケンスに最適で、弊社の販売しているシーケンスキットにも採用しております。

新しい3次元培養肝細胞 *TESTLIVER*™ *-Rat-* の紹介

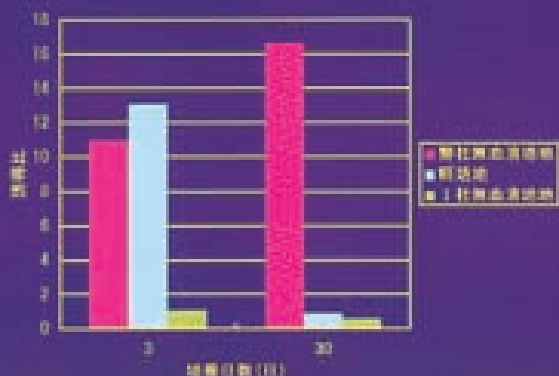
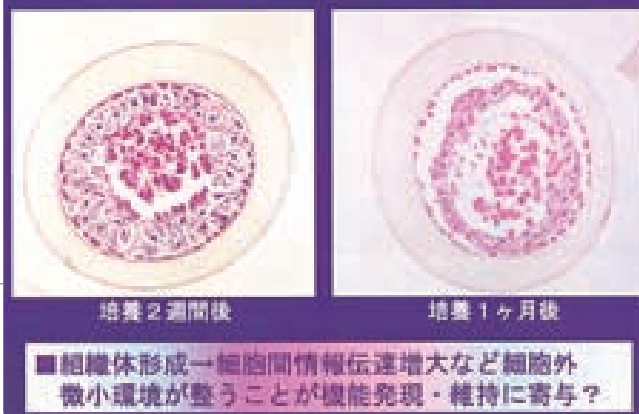
平成14年12月13日（金） 第25回 日本分子生物学会 ランチョンセミナー
於 パシフィコ横浜

東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所　山口 達哉

簡便な操作で肝細胞の長期培養実験を行うことができる*TESTLIVER*™ *-Rat-* について標記学会にて発表した内容を抜粋してご紹介いたします。

TESTLIVER™*-Rat-*は、九州大学・船津教授らのグループが開発した遠心充填法を利用して製品化されました。遠心充填法は、遠心力によって細胞同士の接触頻度を高めた細胞凝集体を中空糸内腔に形成させます。中空糸は多孔性膜から成り、栄養・ガス交換を効率良く行うことにより中空糸内腔細胞の高密度培養を達成しています。

中空糸内腔に形成された細胞の凝集体は2～3日間の培養を経ると表面の滑らかな組織体を形成してきます。この組織体（オルガノイド）が肝細胞機能を長期間維持することが船津教授らによって報告されています。

TESTLIVER™の肝細胞機能のうち、薬物代謝酵素誘導について報告します。図はフェノバルビタールによるCYPⅡB1誘導について調べた結果です。pentoxyresorufinを用いた測定系で*TESTLIVER*™では培養1ヶ月後も高い誘導比が得られました。メチルコラントレンによるCYPIA1誘導についても同様の結果が得られています。この他、アルブミン産生、アンモニア代謝能など*TESTLIVER*™は長期間肝細胞機能を維持することがわかりました。

TESTLIVER™の長期間に亘る肝細胞機能の発現・維持は専用の無血清培地に依るところも大きいと考えられます。弊社ラット肝細胞無血清培地、I社肝細胞用無血清培地、WE培地（血清、Insulin、dexamethasone添加）の3者で*TESTLIVER*™を培養し、アンモニア代謝能の推移を調べました。結果、弊社無血清培地による培養は他の培地に比べ高いアンモニア代謝能を長期間維持しました。

同様にフェノバルビタールによるCYPⅡB1の誘導について調べました。やはり弊社無血清培地では、培養1ヶ月後も高い誘導比を示しました。メチルコラントレンによるCYPIA1の誘導についての比較でも同様の結果を得ています。これらの結果から、*TESTLIVER*™とこの無血清培地を組み合わせて使用することにより、非常に有用な肝細胞培養系が得られることがわかります。

TESTLIVER™の組織切片のHE染色像です。中心部の細胞は死んでいることがわかりましたが、組織体周囲に沿って細胞が比較的きれいに並んでいるのが観察されました。培養1ヶ月後もこの細胞の並んだ像が観察されました。この保たれた構造（組織体）が肝細胞機能を発揮していると考えられます。

TESTLIVER™の応用の一例としてtotal RNA抽出をご紹介します。*TESTLIVER*™をハサミで細かく切り、その後マイクロチューブ内でホモジナイズしてAGPC法によりtotal RNAを抽出しました。*TESTLIVER*™1本あたり平均約30μgの良質のtotal RNAを回収できました。

以上のように*TESTLIVER*™*-Rat*は、

①肝細胞機能を保持したまま長期間の実験が可能。

②専用培地の併用で、より有用な肝細胞培養系が得られる。

③肝細胞機能研究を始めとした幅広い分野の試験研究に利用可能。

であると考えられます。

TOYOBO

ASP(Allele Specific Primer)-PCR-法

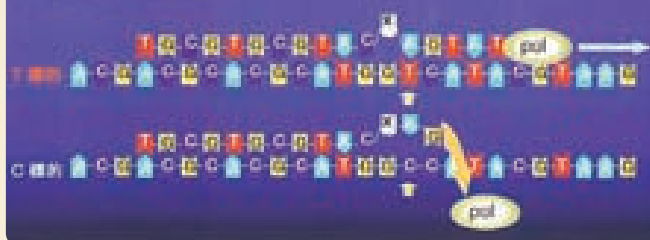
平成14年12月13日（金） 第25回 日本分子生物学会 ランチョンセミナー
於 パシフィコ横浜

東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所　宝田　裕

弊社で開発しました、SNPs（1塩基多型）解析方法と薬剤代謝遺伝子多型解析キット（STKシリーズ）を用いました実施例につきまして、標記学会にて発表した内容を抜粋してご紹介いたします。

ASP(Allele Specific Primer)-PCR 法

1. 3' 末端から2番目に SNP 部位を持つアレル特異プライマー
2. 正確性の高い α 型 DNA ポリメラーゼを使用
3. SNPs 部位以外に人為的ミスマッチ配列の挿入
（自社特許出願済み）

pol

3'末端から2番目の位置にSNPs部位を有し、3'末端から3番目に人為的ミスマッチを有する、各SNPs型に特異的なプライマーを用いた特異伸長反応を示しています。3'末端から2番目の位置がマッチしている場合は、ポリメラーゼによる伸長反応が行われますが、ミスマッチの場合伸長反応が起こりません。

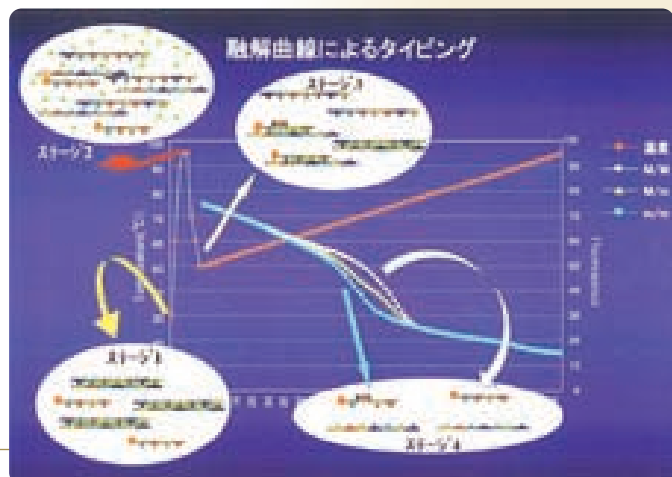
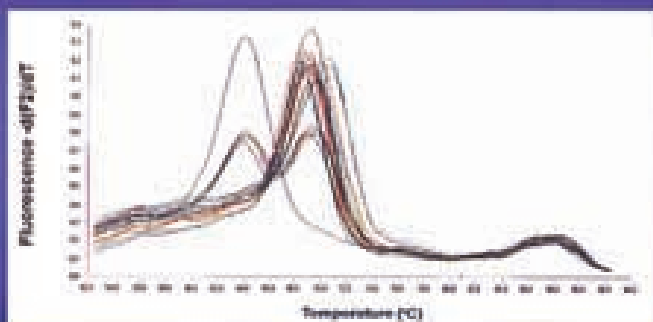
アレル特異プライマーを用いて測定結果の一例を示します。96検体を同時に測り、Cタイプ特異プライマーのシグナルをX軸に、Tタイプ特異プライマーのシグナルをY軸に取った場合、3タイプ（C／C、C／T、T／T）が明確に分類されています。

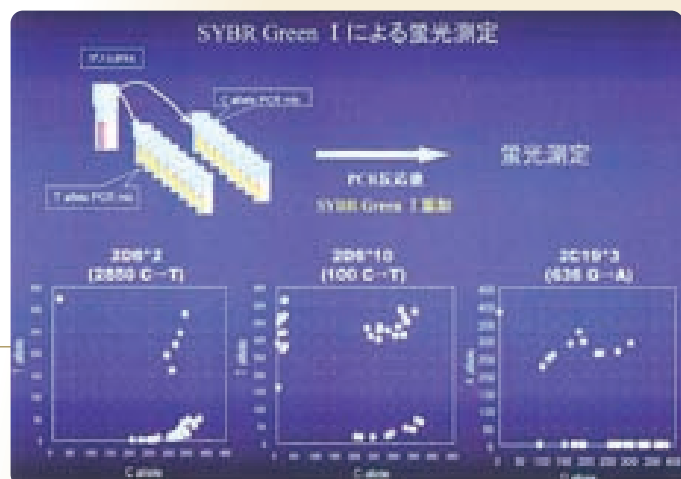
FRETプローブを用いた原理

1. SYBR Green I とFRETシグナルを発生する標識プローブを用いる
2. 1本のプローブで融解曲線法により型分けを行う
3. ホモジニアスな測定が可能

温度を上げて2本鎖に分離

蛍光インターカーレーターと蛍光標識プローブとのFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）反応を模式的に示した図です。標識プローブが2本鎖を形成しているときはインターカーレーターが2本鎖の間に挿入され、蛍光シグナルがプローブの蛍光標識に転移してプローブの蛍光シグナルが得られます。温度を上げるとプローブは1本鎖になりインターカーレーターも蛍光シグナルを出さないので、プローブの蛍光標識からのシグナルも得られなくなります。

ステージ1：PCR産物にインターカーレーターとプローブを添加。インターカーレーターはPCR産物の2本鎖に挿入。
ステージ2：95℃でPCR産物は1本鎖に分離。プローブ、インターカーレーターが混在した状態。
ステージ3：50℃まで下げるとプローブはPCR産物と2本鎖を形成。このときSNPs部位で1塩基のミスマッチがあってもプローブはアニールするように予め設計。インターカーレーターも挿入され、FRETシグナルが完成。
ステージ4：FRETシグナルをモニタリングしながら徐々に温度を上昇。ミスマッチを有するプローブ、パーフェクトマッチしているプローブの順でFRETシグナルが消失。

スライド4で示しました原理を用いてタイピングした例です。横軸は温度、縦軸は（FRETシグナルの変化量/温度の変化量）×（−1）です。グラフより、プローブとミスマッチがあった場合は64℃付近に山が、パーフェクトマッチの場合は70℃付近に山が認められます。ヘテロの場合は両方の山が認められます。3タイプが明らかに区別されています。

本キットを用いて検出した1例を示します。PCR産物をサイバーグリーンで染色し、蛍光リーダーで蛍光量を測定した結果を示します。各SNPs共に3タイプが明確に分類されているのが分かります。

本キットは特異PCRを行った後、増幅産物を電気泳動、蛍光検出などで増幅産物の有無を検出するだけでタイピングできるキットです。ヒトシトクロームP450の比較的日本人に多い多型を揃えています。本キットによるタイピング法は正答率が高く、また非常に簡便ですので、手軽に薬物代謝遺伝子多型の解析にご利用いただけます。

PROTEIOS™ Q&A

TOYOBOテクニカルライン（TEL 06-6348-3888）へお問い合わせの多い商品群ごとに、それらをまとめたQ&Aのコーナーです。

今回は、ご好評いただいております無細胞タンパク質合成試薬“PROTEIOS™”について、多くいただくお問い合わせ内容をまとめてお届けいたします。これらをご参考に、より一層効果的にご利用いただければ幸いです。

〈キットのパーツについて〉

Q1 pEU-DHFRは何のために使用しますか。

A1 pEU-DHFRは、このキットを用いる反応が適切に進んだか否かを確認するためのジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子を組み込んだPositive Control Vectorとして添付されています。

Q2 pEU3-NⅡは、何のために使用しますか。

A2 *in vitro* Transcription用の本キット専用のベクターです。これに合成したいタンパク質の遺伝子を組み込み、mRNAを合成します。

Q3 pEU3-NⅡに含まれるΩ配列とは何ですか。

A3 植物の翻訳系において、翻訳効率を上昇させる配列です。目的遺伝子は、できるだけこのΩ配列のすぐ下流にくるように挿入してください。遠くなりますと翻訳効率が低下する場合があります。

Q4 20回分とは、20well分のことですか、20plate分のことですか。

A4 20well分（反応液で300μlスケール）のことです。

〈キットのパーツについて〉

Q1 何μgのタンパク質が合成できますか。

A1 コントロールのpEU-DHFRを用いた場合、1反応（300μlスケール）あたり約20μgのタンパク質合成が可能です。

Q2 合成したタンパク質は立体構造が維持されていますか。

A2 アミノ酸の一次配列はほぼ確実にできますが、立体構造の形成にシャペロンタンパク質などの関与が必要なタンパク質の場合は、正常な立体構造が形成されない可能性があります。また、膜タンパク質など疎水性の高いタンパク質の場合は凝集してしまう場合があります。

Q3 目的タンパク質は、糖鎖修飾などいわゆる翻訳後修飾がされていますか。

A3 大腸菌など他の抽出液を使用したシステムと同様に、翻訳後修飾されない可能性が高いと思われます。リン酸化は、コムギ胚芽抽出液に含まれるタンパク質リン酸化酵素によって行われる場合がありますが、本来のリン酸化パターンと異なる場合もあります。

Q4 S-S（ジスルフィド）結合は維持されますか。

A4 本キットは還元条件下にて反応を行うためS-S結合は形成されません。

Q5 分子量何kDaまでのタンパク質が合成できますか。

A5 140kDaまでCBB染色での検出例があります。

Q6 大腸菌等を宿主とした場合に発育を阻害するようなタンパク質について、このシステムの使用はできますか。

A6 適用可能です。そのようなタンパク質の合成に、本キットは適していると考えられます。

〈プロトコールについて〉

Q1 反応温度と時間は。

A1 23～26℃で14～24時間反応させます。反応後は冷蔵または冷凍で保存してください。
インキュベーターとして、弊社販売の「PG-Mate™」を利用されると便利です。

Q2 pEU3-NⅡに目的タンパク質の遺伝子を挿入する場合、フレームを考える必要はありますか。

A2 融合タンパク質を作製するのではないので、フレームを考えていただく必要はありません。

Q3 pEU3-NⅡに目的タンパク質の遺伝子を挿入する場合、Ω配列に近い*Eco*RVサイトが一番いいのですか。

A3 Ω配列に近い方が、翻訳効率が高い傾向があります。Ω配列から遠いサイトを利用した場合、不要なMCS部分をDeletionすると効果のある場合があります。

Q4 目的タンパク質の遺伝子には開始コドンと終止コドンが必要ですか。

A4 必要です。インサート側はなるべくORF部分のみにしてください。余分なリーダー配列やエンハンサー配列が残った場合、効率が低下する場合があります。

Q5 pEU3-NⅡに目的タンパク質の遺伝子を挿入した場合の、Positive Cloneの選別法は。

A5 *LacZ*による発現系ではないので、X-galによる青白判定はご利用できません。PCRによるインサートチェックが効果的です。弊社コロニーダイレクトPCR用プレミックス試薬（Insert Check -Ready- : Code.No.PIK-151、PIK-251）をお勧めいたします。

Q6 目的タンパク質の遺伝子を挿入したpEU3-NⅡベ

クターの精製には、通常のミニプレップキットを使用していいのですか。

A6 一時的なプラスミド精製用キットにはRNaseが含まれております。この場合、転写時のRNAの分解を防ぐため、フェノール/クロロホルム抽出の追加が必要です。

Q7 mRNAを作製する時には、pEU3-NIIを直鎖状にする必要がありますか。

A7 その必要はありません。環状のままで転写してください。

Q8 mRNAを作製するときのNTPsは、どのようなものを使用すればいいですか。

A8 弊社リボヌクオチド(NTPs set【各100mM、Code No. NTP-111、¥45,000】やrNTP Mixture【各25mM、Code No.NTP-211、¥18,000】)をご使用ください。

一般にPCR用酵素などに添付されているデオキシリボヌクレオチド(dNTPs)はDNA合成用なので使用できません。

Q9 作製したmRNAの精製には、Sephadex G-25カラム以外にはどんな方法がありますか。

A9 フェノール/クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿を行なうことをお勧めいたします。

Q10 mRNAの精製後の吸光度の測定で、ブランクを水にしてはいけませんか。

A10 必ず、カラムの平衡化に使用した溶液を同様に希釈して使用してください。特に、重層法において、平衡化に使用したBuffer Mixにはアミノ酸等が含まれるため、バックグラウンド値が高くなります。

Q11 反応後も二層のままですが。

A11 不溶性画分が拡散しなかった結果、二層のままに見えることがありますが、反応は正常に行われています。

Q12 Tagを使用して目的タンパク質の精製は可能ですか。

A12 pEU3-NIIには、Tag配列がついていません。Tagを使用する場合は、タンパク質を発現させたい遺伝子にTag配列を付加させてpEU-NIIに組み込みます。

Q13 Tagを付けた目的タンパク質を精製する場合、PROTEIOS™で合成した溶液をそのまま使用してもいいのでしょうか。

A13 試薬にDTTが使用されているため、合成した溶液を直接His-tagカラムにアプライすると、キレートを阻害される場合があるため、His-Tagカラム用吸着液で5〜10倍希釈するか、G-25ゲルろ過を行なうことをお勧めいたします。

〈その他〉

Q1 Heminは含まれていますか。またHeminを添加すると効率が上がりますか。

A1 ウサギ網状赤血球(レテキュロサイト)による、無細胞タンパク質合成系にはHeminが必要ですが、当システムは、コムギ胚芽抽出液によるシステムですので、Heminは必要ありません。このため、Heminは含まれておらず、Hemin添加による効率変化の情報はございません。

Q2 実施例はどれだけありますか。

A2 下記のような事例があります。

タンパク質	由　来	分子量	合成	可溶化	活性
Estrogen receptor α / MBP	Human	82kDa	○	○	○
FK506 binding protein	Human	12kDa	○	○	N.D.
p52	Human	37kDa	○	○	N.D.
MAP kinase	Human	41kDa	○	△	○
C-terminal src kinase	Human	51kDa	○	△	○
Protein kinase C	Human	77kDa	○	×	×
c-Fos	Human	41kDa	○	○	○
c-Jun	Human	36kDa	○	○	○
Protein kinase C α / GST	Human	104kDa	○	×	N.D.
Rhodanese	Calf	33kDa	○	○	○
Green fluorescent protein	*A. victorea*	27kDa	○	○	○
Luciferase	*P. pyralis*	61kDa	○	○	○
Dihydrofolate reductase	*E. coli*	18kDa	○	○	○
β-lactamase precursor	*E. coli*	31kDa	○	○	N.D.
ClpB	*E. coli*	96kDa	○	○	N.D.
GroEL	*E. coli*	57kDa	○	○	N.D.
GroES	*E. coli*	10kDa	○	○	N.D.
KOD DNA polymerase	*Thermococcus*	90kDa	○	○	○
Sarcosine oxidase	*Arthrobactor*	43kDa	○	○	○
Bam H I	*Bacillus*	24kDa	○	○	○
Lipase	*Pseudomonas*	30kDa	○	×	×
Alkaline phosphatase	*E. coli*	52kDa	○	○	○

※:N.D.:未確認。

Q3 CAP構造をmRNAに付加すると、効率が上がりますか。

A3 弊社の検討では、CAP構造の付加の有無はあまり効率に影響しません。Ω配列によって、充分に合成効率が保持されていますので、特にCAP構造を付加させる必要はないと考えます。

Q4 参考文献は。

A4 Y.Endo, *BIO INDUSTRY*, **Vol.17** No.5:p.20〜27(2000)

K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara, Y.Endo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **Vol.97** No.2:p.559-564(2000)

T.Sawasaki et al, *FEBS Letters*, **Vol.514**:p.102-105(2002)

〈トラブルシューティング〉

Q1 コントロールベクターを使用してもmRNAが合成できません。

A1 プロトコール通りの手順であることを確認してください。基質としてdNTPsを使用していませんか。mRNAの合成にはリボヌクオチド(rNTPs)が必要です。また、ベクターのプロモーターに適したRNA Polymeraseを使用されていますか。キット添付のベクター以外を使用されている場合には、プロモーターをご確認ください。

※:弊社下記ホームページ上では、さらに詳しい内容を紹介しております。

http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/proteios/proteios.html

●終売のお知らせ●

下記商品につきまして、販売中止とさせていただくことになりました。
長らくご愛顧頂き、誠にありがとうございました。

該当商品

メーカー	品名及び内容	包　装	Code No.	価　格	販売中止日
TOYOBO	**SuperReading DNA Sequence Solution**	125ml	SRS-101	¥16,000	2003.4. 9
TOYOBO	**TOYOBO DNA Purification Kit**	1set	PUR-101	¥20,000	2003.4.18
BIOMATE	**Page Set SQC-6A**	60ml×10本	BI090207	¥14,000	2003.4.18
BIOMATE	**Page Set SQC-5ALN**	60ml×10本	BI090221	¥28,000	2003.4.18
STRATAGENE	**RNA Transcription Kit**	T3, T7各100回用	SC200340	¥53,000	2003.5.31
Maxim Biotech	**Rubella Virus, Primer Set Plus Positive Control**	100回用	MBSP10585	¥29,000	2003.5.31